

한랭이 피부장벽에 미치는 영향

연세대학교 원주의과대학 피부과학교실¹, 울산대학교 의과대학 피부과학교실²,
순천향대학교 의과대학 피부과학교실³, 연세대학교 의과대학 피부과학교실⁴

김민정¹ · 박하나² · 이상훈³ · 이승현⁴ · 안성구¹

The Effect of Cold on the Skin Barrier

Minjeong Kim, M.D.¹, Hana Bak, M.D.², Sanghoon Lee, M.D.³, Seung Hun Lee, M.D.⁴, Sung Ku Ahn, M.D.¹

*Department of Dermatology, Yonsei University Wonju College of Medicine¹, Wonju,
Ulsan University College of Medicine², Soonchunhyang University College of Medicine³,
Yonsei University College of Medicine⁴, Seoul, Korea*

Background: Cold is considered an important environmental factor on the skin's barrier function. It is also known that cold can disrupt the barrier's permeability function. Historically irritant contact dermatitis develops frequently amongst fish processing workers. This means that cold may disrupt the skin barrier function. However, there are only a few studies of the effect of cold on the skin barrier.

Objective: The aim of our study was to investigate the effects of exposure to the cold on the skin's barrier permeability, calcium gradient and cornified enveloped proteins.

Methods: Hairless mice were classified into four groups as follows; tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1), exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2), exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3), and tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4). Next, rate of barrier recovery was measured, and skin of cold exposure site was taken for immunohistochemistry of cornified enveloped protein, calcium ion capture chemistry and in situ hybridization.

Results: Rate of barrier recovery of Group 1 was measured at -56.33%, the most delayed rate of all groups. Rate of barrier recovery of other groups were measured as follows; Group 2 (20%), Group 3 (55%) and Group 4 (41.78%). In calcium-ion capture cytochemistry, Group 1 appeared to absent calcium deposit in the entire epidermis. Group 3 appeared to the highest density of calcium in entire epidermis. In immunohistochemical staining of cornified enveloped proteins including involucrin, loricrin and filaggrin, Group 1 resulted in the lowest expression of cornified enveloped proteins. Of all groups, Group 3 appeared to have the highest expression of cornified enveloped proteins. In situ hybridization of loricrin and filaggrin, expression were similar with results of immunohistochemical staining.

Conclusion: Our results provide that cold impairs the skin's barrier permeability by having a negative effect on recovery of calcium gradient and differentiation of cornified enveloped proteins. But occlusion with vapor permeable membranes such as Gore-Tex or petrolatum could improve conditions of skin barrier impaired by cold by restoring the recovery rate of calcium gradient and differentiation of cornified enveloped protein. (**Korean J Dermatol 2008; 46(4):437~445**)

Key Words: Barrier recovery, Calcium gradient, Cold, Cornified enveloped proteins, Transepidermal water loss

< 접수: 2007년 11월 29일 >

*이 논문은 연세대학교 원주의과대학의 연구비(2006년)의 지원으로 이루어진 것임.

교신저자: 안성구, 220-701, 강원도 원주시 일산동 162, 연세대학교 원주의과대학 피부과학교실

전화: 033)741-0621, Fax: 033)748-2650, E-mail: ahnsk@yonsei.ac.kr

서 론

피부는 외부 환경과 직접적으로 접하고 있는 광범위한 기관으로서 수분과 전해질의 손실을 막고, 세균의 침입을 막아주며 물리화학적 손상으로부터 인체를 보호하는 보호 장벽의 기능이 있다¹⁻³. 표피에서 각질층은 벽돌 역할을 하는 단백질로 이루어진 각질세포와 벽돌을 단단하게 접착시키는 연속적인 층상구조의 지질이 서로 일정한 구조를 나타내므로 'brick and mortar'이라고 한다⁴.

장벽에서 벽돌로 비유되는 각질세포의 케라틴은 피부의 구조적 안정성과 탄력성을 제공하며, involucrin, loricrin, filaggrin 등의 특이한 전구 단백질의 연속적인 결합 및 다단계 과정에 의해 생성된다⁵.

각질세포간 지질은 세라마이드, 콜레스테롤, 지방산이 다수의 층판으로 연결되어 있으며, 각질층의 하부에서 생산되는 층판소체의 내부에 전구물질로 존재하며, 과립층과 각질층의 경계부에서 세포 외로 분비된다. 층판소체의 분비는 표피로부터 지질함량이 증가함으로써 유지되고 새롭게 보충되며, 이러한 지질생성은 피부장벽의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하게 된다^{4,6,7}.

칼슘 이온은 피부장벽의 형성과 손상에 의한 각질형성세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다. 그러나 이러한 칼슘 농도는 유극층에서 가장 높으며 기저층에서 가장 낮게 분포한다. 이러한 칼슘 기울기(calcium gradient)는 피부투과 장벽의 항상성뿐만 아니라 표피의 증식과 분화, 각질세포외막의 형성, 표피지질의 합성 등에도 매우 중요한 역할을 한다. 장벽 손상 후에 빠르게 회복되는 과정을 보이며, 피부장벽의 손상도 동시에 회복되는 양상을 보인다^{8,9}.

이러한 피부장벽은 당질 코르티코이드, 안드로겐과 같은 호르몬^{10,11}, 스테로이드나 HMG-CoA reductase 억제제¹², 필수지방산이 결핍된 음식¹³, 장기간의 수화¹⁴, 건조한 환경¹⁵⁻¹⁷, 스트레스¹⁸, 아세톤, 계면활성제와 같은 화학적 요인 물리적 자극 등에 의해 손상될 수 있다¹⁹⁻²¹. 손상 받은 피부장벽은 유해한 외부의 물리적·화학적 손상 및 미생물의 침투를 용이하게 할 뿐 아니라 아토피, 건선, 건조 피부 등의 피부장벽의 손상을 동반하는 여러 질환과 관계가 있다. 손상된 장벽기능의 회복은 피부의 기능을 유지하여 인체가 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 담당한다¹.

한랭(cold)은 각질세포간 지질의 생성에 관여하는 층판소체의 형성과 분비를 억제하여 피부장벽의 회복을 지연시키는 것으로 알려져 있다^{22,23}. 그 예로 특히 겨울철이나 냉동 창고 등에서 일하는 사람은 피부장벽 기능의 이상을 초래할 수 있는 환경에 더 노출되므로 직업성 피부염이 호발된다. 그러나 피부장벽의 측면에서 병태생리는 정확하게 규명되지 않은 실정으로 기존의 연구는 한랭과 각질세포간 지질과 칼슘 기울기에 대한 보고였으며, 각질세포외막의 분화에 미치는 영향에 대한 결과는 미미한 실정이다.

최근의 연구에 의하면 이러한 급성 장벽 손상 후의 칼슘 기울기의 회복은 한랭에 의해서 억제되고, Gore-Tex나 pe-

trolatum을 도포하면 장벽기능의 회복이 증가된다는 사실이 밝혀졌다³. 또한 각질세포외막의 형성에 칼슘 기울기가 중요하게 작용하기 때문에 한랭에 의해서 칼슘 기울기 회복이 억제되면 각질세포외막이 억제된다는 가설이 있으나 아직까지 실험적으로 증명되지 않았다. 이에 연구자들은 한랭이 각질세포외막의 분화와 칼슘기울기의 형성에 미치는 영향 및 인위적 피부장벽(Gore-Tex, petrolatum)이 각질세포외막의 분화와 칼슘기울기 형성에 미치는 영향을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험 동물

각 군당 6마리의 생후 7~8주의 수컷 무모생쥐(hairless mice: Hr/Hr)를 온도 22°C, 습도 40~60% 사이의 사육 조건 하에서, 동일한 표준 사료와 수분을 공급하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

Tape-stripping 후 4°C에 5시간 동안 노출 시킨 군(1군), tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군), tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군), tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)으로 구분하였다. 각각의 그룹(n=6)에 대해서 경표피수분손실(trans epidermal water loss, TEWL)의 측정과 배부에서 피부 생검을 시행하였다.

4% chloral hydrate에 의해 마취된 무모생쥐의 체온을 유지하기 위해 35~36°C의 hot bath를 이용하여 무모생쥐를 작은 용기에 올려놓은 상태에서 진행하였다. 50 cc의 syringe (직경 3 cm)의 하부를 절단하여 만든 원통형의 모형을 만들고, 접착제를 사용하여 무모생쥐 피부에 부착한 이후에 한랭 노출을 하였다. 무모 생쥐에 4°C 한랭을 노출하기 위해 Ca²⁺이 없는 10% D/W 용액을 얼려 얼음을 만들었다. 용기 안에 얼음 조각을 넣어 무모생쥐 표면에 밀착시킨 후 지속적으로 얼음을 교체하였다³.

1) 경표피수분손실(TEWL)의 측정

(1) 실험 전: 일정한 습도와 온도가 유지되는 공간에서 무모생쥐의 복강 내로 4% chloral hydrate를 주사하여 마취시킨 후, 실온에서 Tewameter 210™ (Courage + Khazaka, Köln, Germany)을 이용하여 무모생쥐의 배부의 TEWL을 측정하였다(A=Basal TEWL).

(2) 급성 피부장벽 손상 후: 실험 시작 전 무모 생쥐의 TEWL을 측정한 후(A=Basal TEWL) 배부에 접착테이프를 여러 번 붙였다 떼기(tape-stripping method)를 반복하여 물리적으로 급성 피부장벽의 손상을 유발한 후(TEWL ≥ 40 mg/cm²/hr) 바로 TEWL을 측정하였다(B=0h TEWL). 1, 2, 3군에서 5시간 동안 한랭(4°C) 노출하였고, 대조군(4군)은 실온(25°C)에 노출하였다. 실험종료 15분 후에 각 군에서 TEWL을 측정하였다(C=5 h TEWL). 다음 공식에 따라 각

군의 피부장벽 회복률을 측정하여 비교하였다.

$$\text{피부장벽 회복률(Barrier recovery rate)} = \frac{(B-C) \times 100}{(B-A)}$$

2) 조직생검

(1) **광학 현미경 소견**: 한랭 노출부위에서 조직 생검을 시행하였으며, 검체는 10% 중성 포르말린에 고정 후에 수세, 파라핀 포매 과정 및 2 µm 연속절편을 만들어 헤마톡실린-에오신 염색(H&E stain) 후에 광학현미경 하에서 표피의 변화를 비교하였다.

(2) **칼슘이온 캡처 세포화학적 염색법**: 칼슘 기울기의 변화를 측정하기 위하여, 조직을 얻은 즉시 2% glutaraldehyde, 2% 포름알데하이드, 90 mM potassium oxalate (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA), 1.4% 자당으로 구성된 고정액에 조직을 고정하였다. 입체 현미경 하에서 냉고정액 1방울을 점적 한 후 0.5 mm³로 세절하여 얼음조각 위에서 하룻밤 동안 고정하였다. 고정액을 버리고 1 ml 4% OsO₄와 3 ml 2% potassium pyroantimonate stock 용액이 혼합된 고정액으로 얼음 위에서 2시간 동안 고정하였다. 수산화 칼륨 용액을 사용하여 pH 10으로 조절된 냉증류수에 10분간 세수한 후에 통상적인 방법으로 탈수, 포매하고 염색하였다. 대조 표본은 10 mA 에틸렌디아민 사아세트산에서 10분간 배양하였다. 준비된 표본을 투과전자현미경 (Joel, Tokyo, Japan)으로 표피의 칼슘이온의 분포를 관찰하였다.

(3) **면역조직화학 염색(ABC 방법)**: 파라핀 포매조직을 4 µm로 박절하여 탈 파라핀과 합수과정을 거친 후 3% 과산화수소 메탄올 용액으로 5분 동안 조직내의 내인성 과산화 효소의 활동을 저지시키고 증류수로 행궜다. 인산염-완충 식염수에 담근 후에 단백질화의 비특이성 결합을 억제시키기 위해 정상 산양 혈청에 5분간 노출하였다. 이후에 일차항체인 involucrin, loricrin, filaggrin (이상 Bio-medical Technologies Inc., MA, USA)을 각각 1 : 10, 1 : 200, 1 : 70으로 희석하여 30분간 반응시켰으며 이후에 인산염-완충식염수에 세척하였다. 이차 항체는 biotinylated anti-mouse IgG (DAKO, Glostrup, Denmark)를 사용하여 10분간 인산염-완충 식염수에 수세시키고 3-amino-9-ethyl-carbazole (ACE)를 이용하여 발색시켰다. 헤마톡실린으로 대조 염색하고 crystal mount로 봉입하여 관찰하였다.

(4) **In situ hybridization**: Loricrin, profilaggrin의 유전자 단위의 mRNA 발현을 비교하기 위하여 loricrin (3'-noncoding region, 200 bases)과 profilaggrin (coding region, 300 bases) mRNA를 감지하는 Digoxigenin (DIG) labeled RNA probe는 linearized cDNA sequences (미국국립보건원, Yuspa)로 만들었다. 염색 방법은 Komuves 등의²⁴ 방법에 따라 시행하였다. 즉 절편은 40°C에서 보합 결합하고, 내인성 mRNA에 대한 DIG labeled probe의 보합 결합은 Boehringer-Mannheim에서 제작한 anti-DIG-alkaline phosphatase로 감지하였다. Alkaline phosphatase의 활성도는 2 mM levamisole이 함유된 5-bromo-4chloro-3-indol-yl phos-

phate/nitrotetrazolium blue substrate에 의해 결정하였다.

3) 통계학적 분석

피부장벽 회복률은 1군과 다른 군의 비교를 위해 ANOVA 분석을 사용하였다. 유의수준은 0.05 이하를 통계적 의미가 있는 것으로 설정하였다.

결 과

1. 급성 피부장벽 손상 후 한랭 노출에 의한 피부장벽 회복률

Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)의 경표피수분손실 회복률은 -56.33%이었다. Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)의 경표피수분손실 회복률은 55.03%로서 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군, 41.78%)보다 높았다. Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)의 경표피수분손실 회복률은 20%이었으나 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)보다 낮았다. 1군은 나머지 실험군(2, 3, 4군)에 비해 경표피수분손실의 회복률이 현저하게 저하되어 있었으며 이는 ANOVA 분석을 통해 통계학적으로도 차이가 있었다(ANOVA; $p < 0.01$)(Fig. 1).

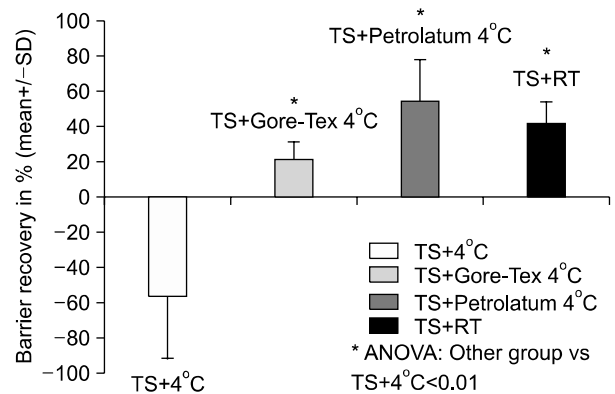


Fig. 1. Rate of barrier recovery (%) at 5 hours after tape-stripping (TS). Tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1; TS+4°C), barrier recovery is delayed severely. Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3; TS+petrolatum 4°C) reveals highest barrier recovery rate, on the contrary, than tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4; TS+RT, RT: room temperature). And exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2; TS+Gore-Tex 4°C), barrier recovery is restored than Group 1 (TS+4°C). Data shown represent mean ± SD the percent barrier recovery at 5 h (n=6 for each group). Statistical analysis is performed using ANOVA.

2. 광학현미경 소견

4°C 한랭에 노출된 모든 군(1, 2, 3군)은 한랭에 의해 각질형성세포의 핵 주위로 공포성 변성이 관찰되었다(Fig. 2A~2C). Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)은 다른 군에 비해 각질층을 포함한 표피의 전 층이 두꺼워져 있었다(Fig. 2C). Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)에서 각질층이 관찰되었으며, 표피의 두께는 한랭 단독 노출군보다 두꺼워져 있었다(Fig. 2B, 2D). Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)은 한랭노출에 의한 각질세포 핵 주위에 공포성 변성과 더불어 각질층이 거의 관찰되지 않으며 표피 두께가 가장 얇았다(Fig. 2A).

3. 칼슘이온 캡처 세포화학적 염색소견

Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)은 5시간 후에도 표피에 칼슘이 거의 존재하지 않았다(Fig. 3A).

Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)은 급성 피부장벽 손상 5시간 후 표피의 상층부에 칼슘침착이 모든 실험군 중 가장 많이 관찰되었다(Fig. 3C). Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)은 표피의 상층부와 하부에 칼슘이 침착되어 칼슘 기울기의 회복소견이 부분적으로 관찰되었다(Fig. 3B, 3D).

4. 면역조직화학 염색소견

1) Involucrin

Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)은 involucrin이 표피 전 층에서 거의 관찰되지 않았다(Fig. 4A). Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 과립세포층과 유극층 일부에서 가장 강양성 반응을 보였다(Fig. 4C). Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)은 중등도의 양

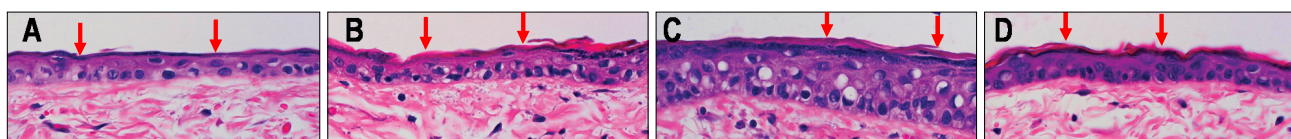


Fig. 2. Light microscopic observation of the epidermis. (A) Tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1) reveals no stratum corneum and very thinned thickness of epidermal layer. (B) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2) reveals a little stratum corneum and epidermal layers more than Group 1. (C) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3) reveals most thickened stratum corneum and epidermal layer. (D) Tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4) shows similar results to Group 2.

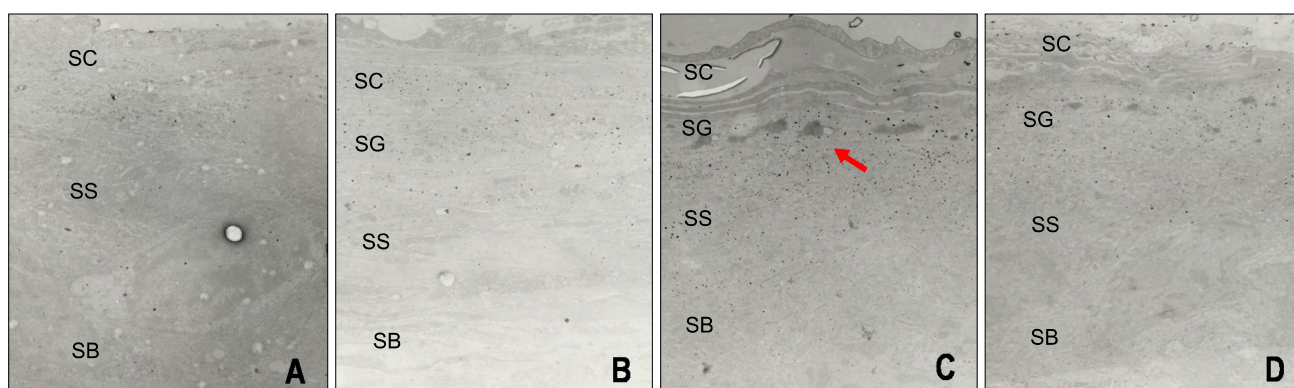


Fig. 3. Visualization of calcium gradient by calcium-ion capture cytochemistry. (A) Tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1), the Ca deposit is absent in entire epidermis. (B) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2) reveals a moderate Ca deposit. (C) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3) reveals the highest density of Ca in entire epidermis. (D) Tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4), Ca deposit is similar to Group 2. SC: Stratum corneum, SG: Stratum granulosum, SB: Stratum basale, Calcium deposit (red arrow)

성 소견을 보였다(Fig. 4B, 4D).

2) Loricrin

Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)은 involucrin과 마찬가지로 표피 전 층에 걸쳐 loricrin의 발현은 거의 없었다(Fig. 5A). Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 가장 강 양성 반응을 보였으며(Fig. 5C), tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)에서 과립층과 유극층의 일부에서 중등도의 양성 소견 보였다(Fig. 5B, 5D).

3) Filaggrin

Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)은 involucrin, loricrin과 마찬가지로 표피 전 층에 걸쳐 filaggrin의 발현이 거의 없었다(Fig. 6A). Filaggrin도 involucrin,

loricrin과 유사하게 tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 가장 강 양성 반응을 보였으며(Fig. 6C), tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)에서 과립층과 유극층의 일부에서 중등도의 양성 소견 보였다(Fig. 6B, 6D).

5. In situ hybridization 소견

1) Loricrin

면역조직화학 염색소견과 유사하게 in situ hybridization을 이용한 loricrin의 반응은 tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)에서 가장 미약하였다(Fig. 7A). Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조

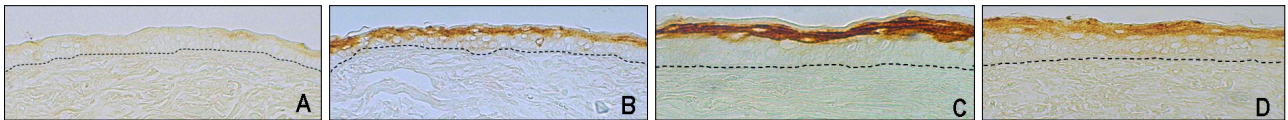


Fig. 4. Immunohistochemical staining of involucrin. (A) Tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1). (B) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2). (C) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3). (D) Tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4). Group 1 results in lowest expression of involucrin (A). Of all groups, Group 3 shows the highest expression of involucrin (C). Other two groups, Group 2 and Group 4 shows moderate expression of involucrin in the outer epidermis (B and D). Basement membrane (dotted line)

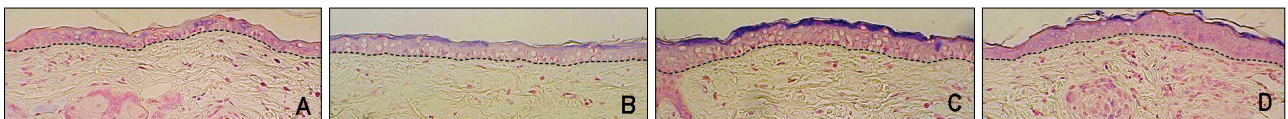


Fig. 5. Immunohistochemical staining of loricrin. (A) Tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1). (B) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2). (C) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3). (D) Tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4). Group 1 results in lowest expression of loricrin (A). Of all groups, Group 3 shows the highest expression of loricrin (C). Other two groups, Group 2 and Group 4, shows moderate expression of loricrin in the outer epidermis (B and D). Basement membrane (dotted line)

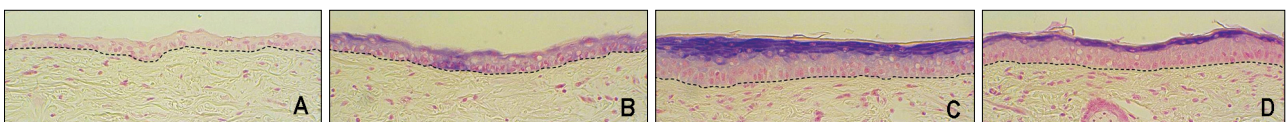


Fig. 6. Immunohistochemical staining of filaggrin. (A) Tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1). (B) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2). (C) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3). (D) Tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4). Group 1 results in lowest expression of filaggrin (A). Of all groups, Group 3 shows the highest expression of filaggrin (C). Other two groups, Group 2 and Group 4 shows moderate expression of filaggrin in the outer epidermis (B and D). Basement membrane (dotted line)

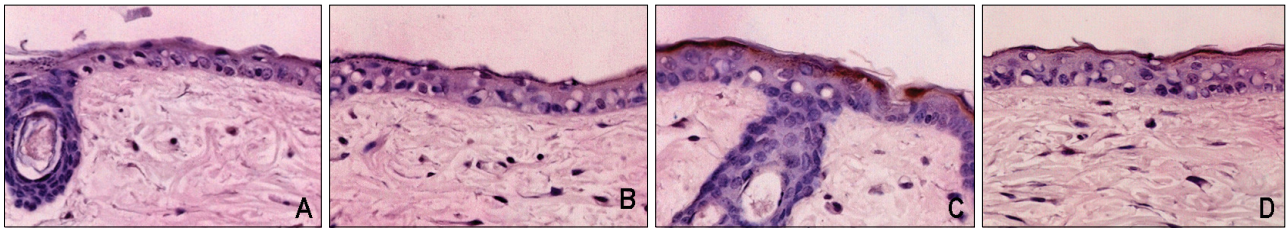


Fig. 7. In situ hybridization of loricrin. (A) Tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1). (B) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2). (C) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3). (D) Tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4). Group 1 result in lowest mRNA expression of loricrin (A). Of all groups, Group 3 shows the highest mRNA expression of loricrin (C). Other two groups, Group 2 and Group 4 shows moderate mRNA expression of loricrin (B and D).

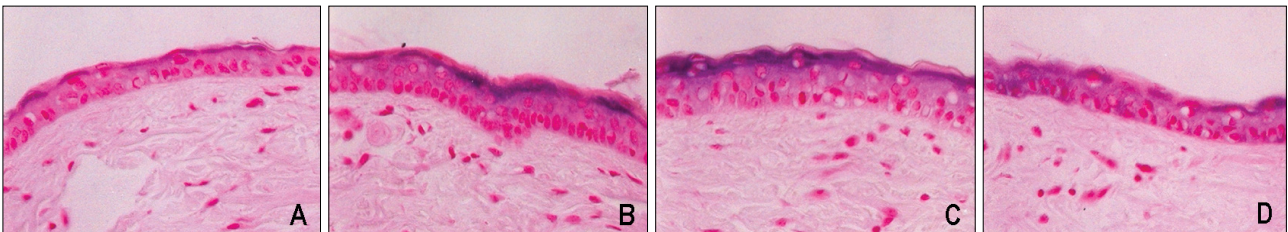


Fig. 8. In situ hybridization of filaggrin. (A) Tape-stripping and exposure to cold (4°C) for 5 hours group (Group 1). (B) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and occlusion with Gore-Tex group (Group 2). (C) Exposure to cold (4°C) for 5 hours after tape-stripping and applying with petrolatum group (Group 3). (D) Tape-stripping and exposure at room temperature (25°C) for 5 hours group (Group 4). Group 1 result in lowest mRNA expression of filaggrin (A). Of all groups, Group 3 shows the highest mRNA expression of filaggrin (C). Other two groups, Group 2 and Group 4 shows moderate mRNA expression of filaggrin (B and D).

군(4군)에서 표피 상부에 중등도의 양성 반응을 보였다 (Fig. 7B, 7D). Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 가장 강 양성 반응을 보였다 (Fig. 7C).

2) Filaggrin

Filaggrin의 발현도 loricrin의 반응과 유사하여, tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)이 가장 약한 반응을 보였다 (Fig. 8A). Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온 (25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)에서 표피 상부에 중등도의 양성 반응을 보였다 (Fig. 8B, 8D). Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 발현이 강하게 나타났다 (Fig. 8C).

고 찰

한랭이 피부장벽에 미치는 영향에 대한 연구는 Halkier-Sorensen 등^{22,23}의 냉동 창고에서 작업하는 사람에서 건조 피부와 습진이 많이 발생하는 것에 착안하여 시작되었다. 냉동창고 근로자들은 작업에 의한 한랭 노출 및 작업환경

에서 벗어난 후 상온에 피부가 노출되면 균열과 건조 증상이 발생하였다. Halkier-Sorensen 등^{22,23}은 한랭이 피부장벽을 손상시킨다고 가정하여 무모생취를 사용한 연구를 시행하였다. 아세톤으로 급성 피부장벽 손상시킨 후 한랭에 5시간 노출한 결과 피부장벽의 회복률이 감소하였다. 그들은 피부장벽을 손상시키는 기전으로 피부손상 후에 층판소체의 형성과 분비의 억제에 의해 표피지질이 감소되어 발생하는 것으로 간주하였다. 또한 Elias 등의 보고에 의하면³ 한랭은 장벽손상 후에 칼슘기울기의 회복을 지연시킨다고 주장하였다. 즉 한랭은 층판소체의 감소로 인한 표피지질 합성의 저하와 칼슘기울기의 소실에 의해 피부장벽을 손상시킨다.

세포화학적 연구에 의하면 피부에는 칼슘기울기가 존재한다^{25,26}. 칼슘 이온은 기저층과 유극층에는 낮고 상층으로 갈수록 증가되며, 과립층에서 가장 높게 분포한다. 또한 기저층의 낮은 칼슘농도는 세포의 증식을 일으키고, 과립층의 높은 칼슘이온은 세포분화와 연관이 된다^{3,27,28}. 칼슘기울기는 피부장벽의 형성과 손상 후의 회복 그리고 세포분화 조절에 영향을 준다^{25,26,28}. 피부 장벽의 급성 손상 시 상부 표피의 칼슘이온 소실에 의해 칼슘기울기가 소실되지

만 5~6시간 후에는 60~70%의 피부장벽 회복률과 더불어 칼슘농도와 기율기가 회복된다^{25,27}. 이러한 칼슘기율기의 초기 변화는 증판소체의 분비를 증가시켜 피부장벽의 회복을 자극하게 된다^{9,27,29}. 피부 장벽이 회복됨에 따라 과립층에 칼슘이온의 농도가 증가하여 기율기가 회복되는데, 이러한 표피 바깥쪽 각질세포의 칼슘 함유량 변화에 의해 장벽회복 반응이 조절된다^{8,27}. 그러나 본 연구 결과에서 tape-stripping 후 4°C에 5시간 동안 노출시킨 군에서 5시간 후에도 칼슘이온의 침착이 전혀 없었으나, Gore-Tex, petrolatum을 도포한 군, 대조군에서 피부장벽의 회복률이 높아짐에 따라 칼슘이온의 침착이 증가되었다. 한랭 노출 시 피부장벽 회복 지연은 증판소체의 감소와 연관이 있다²³. 그러므로 증판소체의 감소가 칼슘기율기의 소실에 의함을 뒷받침하고 있다.

경표피수분손실(TEWL)은 피부장벽 손상 후에 장벽의 회복에 중요한 역할을 한다^{29,31}. 피부 손상 시 피부를 통한 수분이동이(Transcutaneous water flux) 전혀 없으면 피부는 손상을 인지하지 못하게 되어 피부 손상회복이 이루어지지 않게 된다. 즉, 급성 피부 손상 후 latex와 같은 수분 불투과성 막으로 밀폐하여 피부를 통한 수분이동을 완전히 차단하게 되면 피부장벽 회복이 억제되고 표피 지질 합성이 저해되며 칼슘기율기의 회복이 이루어지지 않게 된다^{27,30}. 그러나 피부 손상 후 즉시 Gore-Tex와 같은 수분 투과성 막으로 밀폐하거나 petrolatum과 같은 연화제를 도포하면 칼슘기율기의 회복을 증진시키며 더불어 피부장벽 회복이 촉진된다^{3,17,32}. 즉 Gore-Tex와 petrolatum과 같은 인위적 수분 투과성 막은 경표피수분이동을 낮은 정도로 유지하여 손상된 피부의 칼슘기율기와 피부장벽을 회복시키게 된다. 본 연구 결과도 tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)에서 피부장벽 회복률이 가장 낮았으며, 급성 피부장벽 손상 후 회복되지 않는 조건을 보였다. Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)은 1군보다 TEWL의 회복률이 높았다. 특히 petrolatum 도포 군은 실온 노출 군보다도 더 높은 회복률을 보였다. 상기 결과들은 상온에 노출시킨 Elias 등³, Denda 등¹⁶, Ahn 등³²의 실험결과와 유사하였다.

피부장벽의 기능 중에서 각질세포외막은 각질세포간 지질과 더불어 중요한 요소이다^{33,34}. 각질세포외막은 특이한 전구 단백질의 연속적인 결합 및 다단계 과정에 의해 만들어 지는데, 전구물질은 involucrin, cystatin- α , several small praline-rich proteins (SPRP), cornifin, loricrin, elafin, filaggrin 등 여러 구조 단백질들이 알려져 있다^{4,34,35}. 각질세포 외막 형성의 초기 단계는 골격으로 작용하는 involucrin과 cystatin- α 의 교차결합으로 시작된다. 이후에 loricrin, SPRP 침착되고 마지막으로 filaggrin이 각질 필라멘트와 결합함으로써 각질세포외막을 형성하게 된다^{34,36}. 이중에 involucrin은 cornifin과 loricrin에 앞서 합성이 이루어지므로 말기 분화에 있어 가장 초기의 표지자며, 정상 표피의 과립

층 및 유극층 상부에서 발현된다³⁶. Loricrin과 filaggrin은 각질세포외막 형성의 마지막 단계에 관여하여 과립층의 가장 바깥쪽과 각질층에 국한하여 발현되는 단백질이다^{34,36}. 본 연구에 의하면 tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)은 타군(2, 3, 4)에 비하여 현저하게 분화단백질의 발현이 감소되었다. 이는 한랭이 피부장벽에 중요한 역할을 하는 각질세포외막의 형성에 장애를 초래하여, 피부장벽을 손상시킴을 의미한다. 이러한 결과는 한랭이 칼슘기율기를 소실시킴과 연관이 있음을 뒷받침한다. 즉 칼슘기율기는 각질세포 말기 분화에 결정적 인자로 작용하여 각질세포외막(cornified envelop)과 transglutaminase 1의 표현을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{3,28,37}. Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)에 비해 현저하게 각질세포외막이 발현되었다. 즉, tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)에서 각질세포 외막 단백질의 발현 정도는 칼슘기율기 및 피부장벽의 회복률과 일치하였다. 특히 tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 타 군에 비하여 가장 높은 피부장벽의 회복률을 나타내었다. 또한 칼슘기율기의 현저한 뚜렷한 각질세포외막의 발현을 보였다. 즉, 한랭은 칼슘기율기의 소실을 통해 간접 또는 직접적으로 각질세포외막 분화를 억제시키며 이러한 두 가지 영향에 의해 피부장벽이 손상됨을 알 수 있었다.

Petrolatum에 의한 피부장벽의 회복기전은 낮은 수준의 경표피수분손실을 일으키는 막을 형성하며 피부각질층에 투과하여 증판소체층과 유사한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다³⁸. 특히 tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 각질외막단백질의 증가와 칼슘기율기의 회복이 현저하였는데, 증판소체층의 형성에 의한 피부장벽의 회복기능 외에도 칼슘기율기의 회복과 각질외막단백질 형성에 작용할 수 있음을 알 수 있었다.

수분 불투과막과 달리 수분 투과막은 장벽회복을 저해시키지는 않지만 공기노출 군 보다 표피지질 형성이 천천히 이루어지는 것으로 알려져 있다³⁰. 본 실험에서 tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)에서 피부장벽 회복률이 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 군(4군) 대조군보다는 낮았으나 tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)비하여 피부 장벽 회복률이 높게 나타났으며 각질세포외막 단백질의 발현이 더 강하였다. 그러므로 한랭에 노출되는 근로자에게 보호장구나 장벽크림을 도포하는 방법은 피부장벽의 개념상 도움이 될 것으로 사료되며 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)의 피부

장벽 회복률은 -56.33%로 악화되었다. 그러나 tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군), tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군) 및 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)의 회복률은 각각 20%, 55%, 41.78%이었다.

광학현미경 소견상 tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 1, 2, 3군에서 각질형성세포의 핵 주위로 공포성 변성이 관찰되었다. Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)에서 각질층이 거의 관찰되지 않으며, 표피층이 가장 얇았다. Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 각질층을 포함한 표피의 전 층이 가장 두껍게 관찰되었다. Tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)에서도 각질층이 일부 관찰되며, tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)보다 표피층이 두꺼워져 있었다.

Tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)은 표피의 전 층에 칼슘 침착이 전혀 없었다. Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 표피의 상층부에 칼슘 침착이 가장 뚜렷하게 관찰되었으며 tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)의 표피의 상층부에서 칼슘 침착이 일부 관찰되었다.

면역조직화학 염색 소견 상 tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)에서 표피 전 층에서 각질의막단백질인 involucrin, loricrin, filaggrin의 발현이 거의 관찰되지 않았다. Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 involucrin, loricrin, filaggrin의 발현은 강한 양상을 보였으며, tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)에서 중등도의 양성 소견을 보였다.

In situ hybridization 소견상 tape-stripping 후 4°C에 5시간 노출시킨 군(1군)에서 loricrin과 filaggrin의 mRNA 발현이 가장 미약했다. Tape-stripping 후 petrolatum을 도포하고 4°C에 5시간 노출시킨 군(3군)에서 loricrin과 filaggrin의 mRNA 발현이 가장 강하게 나타났으며, tape-stripping 후 Gore-Tex를 덮고 4°C에 5시간 노출시킨 군(2군)과 tape-stripping 후 실온(25°C)에 5시간 노출시킨 대조군(4군)에서 중등도의 양성 소견을 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 장벽 손상 후의 한랭 노출은 칼슘 기율기의 회복과 각질세포 외막의 분화도를 억제하여 피부장벽의 회복이 낮았다. 그러나 수분 투과성의 Gore-Tex 밀폐와 petrolatum과 같은 연화제는 칼슘기율기의 회복과 각질세포외막의 분화에 긍정적으로 작용하여 피부장벽의 회복을 촉진하였다.

참 고 문 헌

1. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983;80:S44-49
2. Elias PM, Choi EH. Interactions among stratum corneum defensive functions. *Exp Dermatol* 2005;14:719-726
3. Elias PM, Ahn SK, Brown BE, Crumrine D, Feingold KR. Origin of the epidermal calcium gradient: regulation by barrier status and role of active vs passive mechanisms. *J Invest Dermatol* 2002;119:1269-1274
4. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991;24:1-26
5. Candi E, Melino G, Mei G, Tarcsa E, Chung SI, Marekov LN, et al. Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem* 1995;270:26382-26390
6. Schurer NY, Plewig G, Elias PM. Stratum corneum lipid function. *Dermatologica* 1991;183:77-94
7. Feingold KR, Man MQ, Menon GK, Cho SS, Brown BE, Elias PM. Cholesterol synthesis is required for cutaneous barrier function in mice. *J Clin Invest* 1990;86:1738-1745
8. Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Qiang M, Feingold KR. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* 1992;89:530-538
9. Menon GK, Price LF, Bommannan B, Elias PM, Feingold KR. Selective obliteration of the epidermal calcium gradient leads to enhanced lamellar body secretion. *J Invest Dermatol* 1994;102:789-795
10. Kao JS, Garg A, Mao-Qiang M, Crumrine D, Ghadially R, Feingold KR, et al. Testosterone perturbs epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2001;116:443-451
11. Kao JS, Fluhr JW, Man MQ, Fowler AJ, Hachem JP, Crumrine D, et al. Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities. *J Invest Dermatol* 2003;120:456-464
12. Menon GK, Feingold KR, Mao-Qiang M, Schauder M, Elias PM. Structural basis for the barrier abnormality following inhibition of HMG CoA reductase in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1992;98:209-219
13. Cho Y, Ziboh VA. Nutritional modulation of guinea pig skin hyperproliferation by essential fatty acid deficiency is associated with selective down regulation of protein kinase C-beta. *J Nutr* 1995;125:2741-2750

14. Ahn SK, Lee EH, Hong SP, Choi EH, Lee SH. The effect of prolonged water exposure on the epidermal permeability barrier. *Korean J Dermatol* 2007;45:23-33
15. Sato J, Denda M, Chang S, Elias PM, Feingold KR. Abrupt decreases in environmental humidity induce abnormalities in permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2002;119:900-904
16. Denda M, Sato J, Tsuchiya T, Elias PM, Feingold KR. Low humidity stimulates epidermal DNA synthesis and amplifies the hyperproliferative response to barrier disruption: implication for seasonal exacerbations of inflammatory dermatoses. *J Invest Dermatol* 1998;111:873-878
17. Schafer P, Bewick-Sonntag C, Capri MG, Berardesca E. Physiological changes in skin barrier function in relation to occlusion level, exposure time and climatic conditions. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;15:7-19
18. Denda M, Tsuchiya T, Elias PM, Feingold KR. Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R367-372
19. Yang L, Mao-Qiang M, Taljebini M, Elias PM, Feingold KR. Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment. *Br J Dermatol* 1995;133:679-685
20. Taljebini M, Warren R, Mao-Qiang M, Lane E, Elias PM, Feingold KR. Cutaneous permeability barrier repair following various types of insults: kinetics and effects of occlusion. *Skin Pharmacol* 1996;9:111-119
21. Schurer NY, Elias PM. The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv Lipid Res* 1991;24:27-56
22. Halkier-Sorensen L, Thestrup-Pedersen K. Skin physiological changes in employees in the fish processing industry immediately following work. A field study. *Contact Dermatitis* 1991;25:19-24
23. Halkier-Sorensen L, Menon GK, Elias PM, Thestrup-Pedersen K, Feingold KR. Cutaneous barrier function after cold exposure in hairless mice: a model to demonstrate how cold interferes with barrier homeostasis among workers in the fish-processing industry. *Br J Dermatol* 1995;132:391-401
24. Komuves LG, Hanley K, Jiang Y, Elias PM, Williams ML, Feingold KR. Ligands and activators of nuclear hormone receptors regulate epidermal differentiation during fetal rat skin development. *J Invest Dermatol* 1998;111:429-433
25. Mauro T, Bench G, Siddaras-Haddad E, Feingold K, Elias P, Cullander C. Acute barrier perturbation abolishes the Ca²⁺ and K⁺ gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J Invest Dermatol* 1998;111:1198-1201
26. Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Br J Dermatol* 1994;130:139-147
27. Menon GK, Elias PM, Lee SH, Feingold KR. Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tissue Res* 1992;270:503-512
28. Elias PM, Ahn SK, Denda M, Brown BE, Crumrine D, Kimutai LK, et al. Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol* 2002;119:1128-1136
29. Menon GK, Feingold KR, Elias PM. Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1992;98:279-289
30. Grubauer G, Elias PM, Feingold KR. Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J Lipid Res* 1989;30:323-333
31. Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J* 2006;47:293-306
32. Ahn SK, Hwang SM, Jiang SJ, Choi EH, Lee SH. The changes of epidermal calcium gradient and transitional cells after prolonged occlusion following tape stripping in the murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1999;113:189-195
33. Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E. Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1998;111:517-523
34. Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 1995;270:17702-17711
35. Elias PM. Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. *Exp Dermatol* 1996;5:191-201
36. Steinert PM. A model for the hierarchical structure of the human epidermal cornified cell envelope. *Cell Death Differ* 1995;2:33-40
37. Cartlidge P. The epidermal barrier. *Semin Neonatol* 2000;5:273-280
38. Ghadially R, Halkier-Sorensen L, Elias PM. Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:387-396